

## ヒト脈絡叢, くも膜組織および髄膜腫における プロスタグランディン D<sub>2</sub> 合成酵素の発現

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

作 田 和 茂

プロスタグランディン D<sub>2</sub> 合成酵素 (prostaglandin D<sub>2</sub> synthase, PGDS) は, プロスタグランディン H<sub>2</sub> を基質としてプロスタグランディン D<sub>2</sub> を合成する酵素で, 脳脊髄液中に多量に含まれているいわゆるベータトレース ( $\beta$ -trace) と同一物質である。本研究では, ヒトの中枢神経における PGDS の役割を知るために, 脈絡叢, くも膜組織および髄膜腫におけるその発現について検索した。対象は, 手術時に採取された2例の脈絡叢と剖検時に採取された6例のくも膜組織, および20例の髄膜腫の手術標本である。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) およびウェスタンブロットでは, 脈絡叢, くも膜絨毛, および髄膜腫の全てに PGDS の mRNA と蛋白の発現がみられた。ただし, 線維型の髄膜腫では他の組織型に比べ, 発現量は少なかった。組織内ハイブリダイゼーションでは, 脈絡叢では脈絡上皮に, くも膜では最外層のくも膜上皮 (barrier cell layer) に, また, くも膜絨毛では外表を覆うくも膜細胞 (cap cell cluster) ではなく, その直下の中芯部 (central core) のくも膜細胞 (core arachnoid cell) に mRNA の発現がみられた。一方, 髄膜腫では, 合胞体型 (syncytial type) と移行型 (transitional type) では mRNA の発現は多数の腫瘍細胞にみられたが, 線維型 (fibrous type) ではごく少数しかみられなかった。免疫組織化学では, 脈絡叢においては脈絡上皮に分泌顆粒様に PGDS 蛋白の発現がみられた。くも膜においては上皮細胞層 (barrier cell layer) にのみ蛋白の発現がみられたが, くも膜絨毛ではくも膜細胞層 (cap cell cluster) にはほとんど蛋白の発現はみられず, 主に線維性中芯 (central core) に発現がみられた。一方, 髄膜腫においては合胞体型と移行型では大多数の腫瘍細胞に PGDS 蛋白の発現がみられ, 特に渦状紋 (whorl) や砂粒体 (psammoma) をとり囲む腫瘍細胞に集中してみられた。線維型では PGDS 蛋白の発現はまばらであった。以上の結果より, ヒト中枢神経においては脈絡叢, くも膜, およびくも膜絨毛において PGDS が産生され脳脊髄液中に分泌されていることが示された。脈絡叢やくも膜は単に脳脊髄液を産生したり髄液腔の境界膜を形成しているのではなく, PGDS を介して中枢神経に対して何らかの液性調節を行っているものと推定された。一方, 髄膜腫においては PGDS がその特異的マーカーになり得ることが示されたと同時に, 髄膜腫に特徴的な組織構造である渦状紋や砂粒体の形成に PGDS が関与していることが推定された。

**Key words** prostaglandin D<sub>2</sub> synthase, choroid plexus, arachnoid, arachnoid villi, meningioma

1961年, Claussen は脳脊髄液中の主要蛋白の1つとしてベータトレース ( $\beta$ -trace) 蛋白を同定した<sup>1)</sup>。ベータトレース蛋白は脳脊髄液に含まれる蛋白としてはアルブミンに次いで多く, しかも血清中の数百倍の濃度で脳脊髄液中に存在する。したがって, ベータトレース蛋白は血清由来の蛋白ではなく, 中枢神経内において独自に産生され脳脊髄液中に分泌される蛋白であると考えられている。近年, 構成アミノ酸の解析により, このベータトレース蛋白は中枢型のプロスタグランディン D<sub>2</sub> 合成酵素 (prostaglandin D<sub>2</sub> synthase, PGDS, prostaglandin-H<sub>2</sub> D-isomerase; (5Z,13E)-(15S)-9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -epidioxy-15-hydroxyprosta-5, 13-dienoate D-isomerase, EC 5. 3. 99. 2) と同一物質であることが解明された<sup>2-6)</sup>。

PGDS は主として哺乳類の中枢神経においてプロスタグランディン H<sub>2</sub> を基質としてプロスタグランディン D<sub>2</sub> (prostaglandin D<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>) を生合成する酵素であり, ラットで

は脈絡叢やくも膜, 乏突起膠細胞, 網膜, 内耳などにおいて発現していることが確認されている<sup>7,8)</sup>。中枢神経における PGDS の生理的機能に関しては, Hayaishi ら<sup>9,10)</sup>は睡眠調節や体温調節, 黄体形成ホルモン放出などと関連があると報告している。一方, Nagata ら<sup>11)</sup>は蛋白の3次構造の解析により PGDS が脂溶性物質の担体であるリポカリンファミリー (lipocalin family) に属することを解明し, 脳脊髄液中で輸送蛋白として機能していることを示唆した。さらに, 多発性硬化症や髄膜炎, および脳血管障害においても, 脳脊髄液中の PGDS 活性が上昇していることが報告されている<sup>12)</sup>。しかし, 現在のところ, ヒトの中枢神経における PGDS の発現様式や機能に関してはほとんど明らかにされていない。そこで, 本研究では, 髄液環境を構成する脈絡叢やくも膜組織, および後者が腫瘍化した髄膜腫を対象として, ヒトの中枢神経における PGDS の発現について検討した。

平成8年11月28日受付, 平成8年12月16日受理

Abbreviations: AMV, avian myeloblastosis virus; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PGD<sub>2</sub>, prostaglandin D<sub>2</sub>; PGDS, prostaglandin D<sub>2</sub> synthase; RT, reverse transcription; TBS, Tris-buffered saline

## 材料および方法

## 1. 組織標本

ヒト脈絡叢と、くも膜組織、および髄膜腫の各材料はそれぞれ下記のように採取した。いずれの材料も標本採取後すみやかに液体窒素で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存して、RNA と蛋白の抽出に供した。組織内ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学用には、4%パラホルムアルデヒドにて標本を固定後パラフィンに包埋した。

## 1. くも膜組織

金沢大学医学部附属病院脳神経外科で死亡し、死後3時間以内に剖検が施行された6例を対象とした。その内訳は、くも膜下出血4例、小脳出血1例、髄芽腫1例であり、年齢は10歳～68歳(平均53.5歳)で、男性2例、女性4例であった。

## 2. 脈絡叢

同じく、開頭による脳室内腫瘍の手術がなされた60歳男性と52歳男性の2症例より標本を採取した。いずれにおいても、術前検査および術中所見にて水頭症や腫瘍の髄腔内播種はみられなかった。

## 3. 髄膜腫

1994年から1996年までの間に外科的に切除された20例を対象とした。病理組織学的分類は、世界保健機構 (World Health Organization, WHO) の脳腫瘍分類 (1993年)<sup>10)</sup>に従った。内訳は、合胞体型 (syncytial type) 12例、移行型 (transitional type) 7例、線維型 (fibrous type) 1例であった。年齢は14歳～81歳(平均55.0歳)で、男性7例、女性13例であった。

## II. 総 RNA の分離と逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR)

組織標本からの総 RNA の抽出精製は、Chomczynski らの方法<sup>11)</sup>に基づいて、ISOGEN (ニッポンジーン、東京) を用いて行った。RT-PCR 反応は、RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2 (宝酒造、大津) を用いて行った。すなわち、 $1\mu\text{g}$  の総 RNA を鋳型として逆転写酵素にて cDNA を合成し、次に各 mRNA に特異的なプライマーを用いて、Taq ポリメラーゼにて cDNA 断片の増幅を行った。ヒト PGDS の塩基配列<sup>12)</sup>より、センスプライマーとして 5'-GACAAGTTCCTGGGGCGCTGGT-3' (194-215)、アンチセンスプライマーとして 5'-GCTGTAGAGGGTGGCCATGC-3' (516-535) を設計し、合成はグライナージャパン (東京) に依頼した。内部コントロールにはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) を用いた。プライマーは既製品 (STRATAGENE, La Jolla, USA) を使用した。その塩基配列は、センスプライマーは 5'-CCACCATGGCAAATTCATGGCA-3' (212-236)、アンチセンスプライマーは 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3' (787-811) であった。PCR 反応には核酸増幅装置 ASTEC PC-800 (サイメディア、東京) を使用した。反応は、 $94^{\circ}\text{C}$ で3分間の熱変性後、 $94^{\circ}\text{C}$ で1分間、 $57^{\circ}\text{C}$ で1分間、 $72^{\circ}\text{C}$ で1分間の3ステップを1サイクルとし、35回増幅した。増幅後の DNA は2%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色後、紫外線照射装置 FAS-II (TOYOBO, 大阪) を用いて検出した。

## III. 組織内ハイブリダイゼーション

## 1. プローブの作成

PGDS の cDNA を鋳型として、PCR 法により PGDS mRNA

に対するアンチセンス DNA プローブ (335-535, 201塩基) を合成し、低融点アガロースを用いて精製、回収した。プローブはオートシーケンサー (ALF DNA Sequencer, Pharmacia Biotech, Milwaukee, USA) で塩基配列を調べ、目的の配列が欠損なく合成されていることを確認した後、ユニバーサルリンケージシステム (KREATECH Diagnostics, Amsterdam, Netherlands) を用いてジゴキシゲニンで標識した<sup>16)17)</sup>。

## 2. 切片の作成と前処理

4%パラホルムアルデヒドで固定したパラフィン包埋標本より厚さ  $6\mu\text{m}$  の切片を作成し、3-アミノプロピルトリエトキシシラン (3-aminopropyltriethoxysilane, APS) 処理スライドガラス (松浪硝子工業、大阪) に張り付け $37^{\circ}\text{C}$ で乾燥した。乾燥した切片をキシレンで脱パラフィン後エタノール系列で親水化し、50mM トリス緩衝食塩水 (Tris-buffered saline, TBS) (pH7.2) で洗浄後、2.5mg/ml の濃度に調整したペプシンで $37^{\circ}\text{C}$ 、30分処理した。次に TBS で洗浄後、エタノール系列で脱水し風乾した。

## 3. ハイブリダイゼーション

標識済みプローブをハイブリダイゼーション緩衝液 ( $4\times$  SSC, 50%ホルムアミド, 10%硫酸デキストラン, 10%デンハルト液, 0.5% Tween 20,  $250\mu\text{g/ml}$  サケ精子 DNA, 0.2

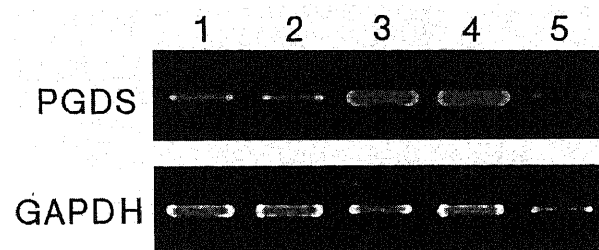


Fig. 1. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of mRNA for prostaglandin  $D_2$  synthase (PGDS) in human arachnoid villi, choroid plexus and meningiomas. cDNA was synthesized from  $1\mu\text{g}$  of total RNA. Expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a housekeeping gene, was also studied as an internal control. PGDS and GAPDH were subjected to 35 cycles of PCR, and the products were resolved on 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Lane 1, arachnoid villi; lane 2, choroid plexus; lanes 3-5, meningiomas (lane 3, syncytial type; lane 4, transitional type; lane 5, fibrous type).

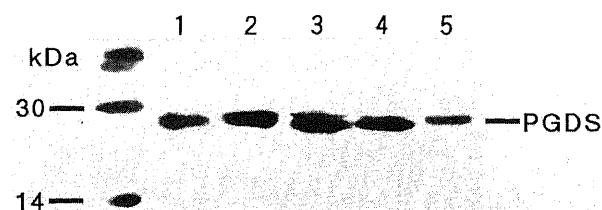


Fig. 2. Western blot analysis of choroid plexus, arachnoid villi and meningiomas. Cell lysates were loaded on 14% polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose membrane, and were detected by rabbit polyclonal antibody against human prostaglandin  $D_2$  synthase. The bands of PGDS were detected at the level of 23 kDa. Lane 1, arachnoid villi; lane 2, choroid plexus; lanes 3-5, meningiomas (lane 3, syncytial type; lane 4, transitional type; lane 5, fibrous type).

mg/ml アジ化ナトリウム) で  $1\mu\text{g/ml}$  の濃度に希釈し、切片の上にのせ  $37^\circ\text{C}$ 、12時間、湿箱中でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後は、TBS で洗浄し、50%ホルムアミド入り  $0.1\times\text{SSC}$  で  $37^\circ\text{C}$ 、15分処理を行い、さらに TBS で3度洗浄した。

#### 4. 発色

ハイブリダイゼーション後の切片に500倍に希釈したアルカ

リホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を  $37^\circ\text{C}$ 、10分反応させ、TBS および純水で洗浄後、ニトロ青テトラゾリウム (nitroblue tetrazolium, NBT) とプロモクロロインドキシルリン酸 (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate, BCIP) を発色緩衝液で希釈した発色液で  $37^\circ\text{C}$ 、15~20分反応させた。最後に、蒸留水で反応を止め、ヌクレアーファーストレッドで核染色を行い、水溶性封入剤で封入した。封入後すみやかに検鏡し、撮影し

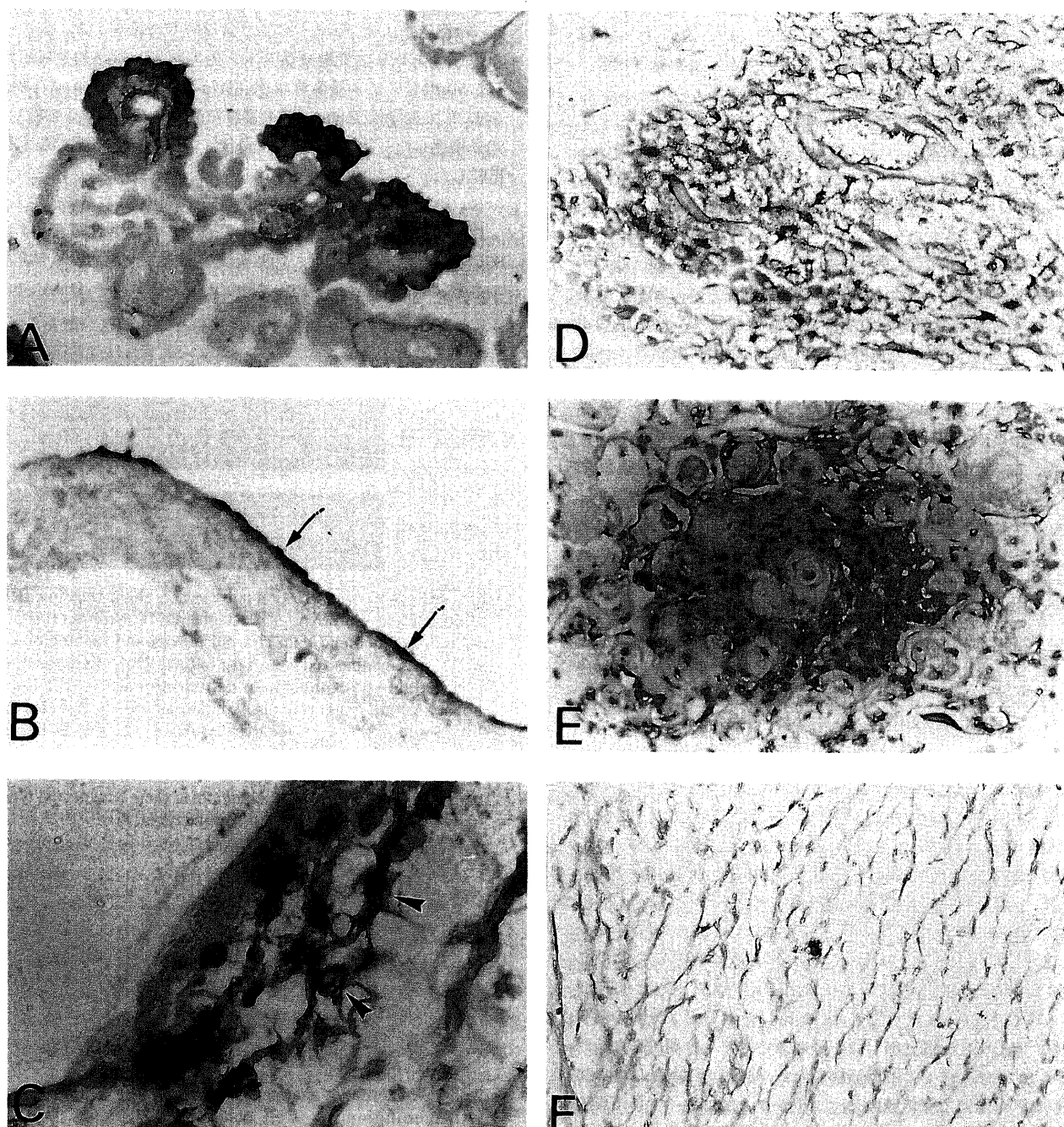


Fig. 3. *In situ* hybridization for prostaglandin  $D_2$  synthase mRNA. Sections were hybridized with antisense oligodeoxynucleotide probe. In choroid plexus (A), the signals were detected in choroid epithelium. In arachnoid (B) and arachnoid villi (C), the signals were, respectively, detected in the superficial barrier cell layer (arrows in B) or core arachnoid cells under cap cell cluster (arrowheads in C). In the syncytial (D) and transitional (E) meningiomas, the signals were detected in most of the tumor cells, while in fibrous type (F), the signals were scarcely detected. B,  $\times 100$ ; A, C, D, E and F,  $\times 200$ .

た.

#### IV. PGDS 特異抗体の準備

ウェスタンブロットングおよび免疫組織化学用には, 以下の如く作製されたウサギ抗ヒト PGDS ポリクローナル抗体 (大阪バイオサイエンス研究所分子行動生物部, 裏出良博士より

供与) を用いた. すなわち, まずヒト脳脊髄液より精製した PGDS 蛋白 500mg をタイターマックスアジュバント (Vaxcel Inc., Norcross, USA) に懸濁し, ウサギ皮下に投与した. その後, 3 週間毎に 100mg を 5 回追加投与し, 最終投与から 7 日目に耳介静脈より採血した. 採取した血液を遠心精製し, 抗

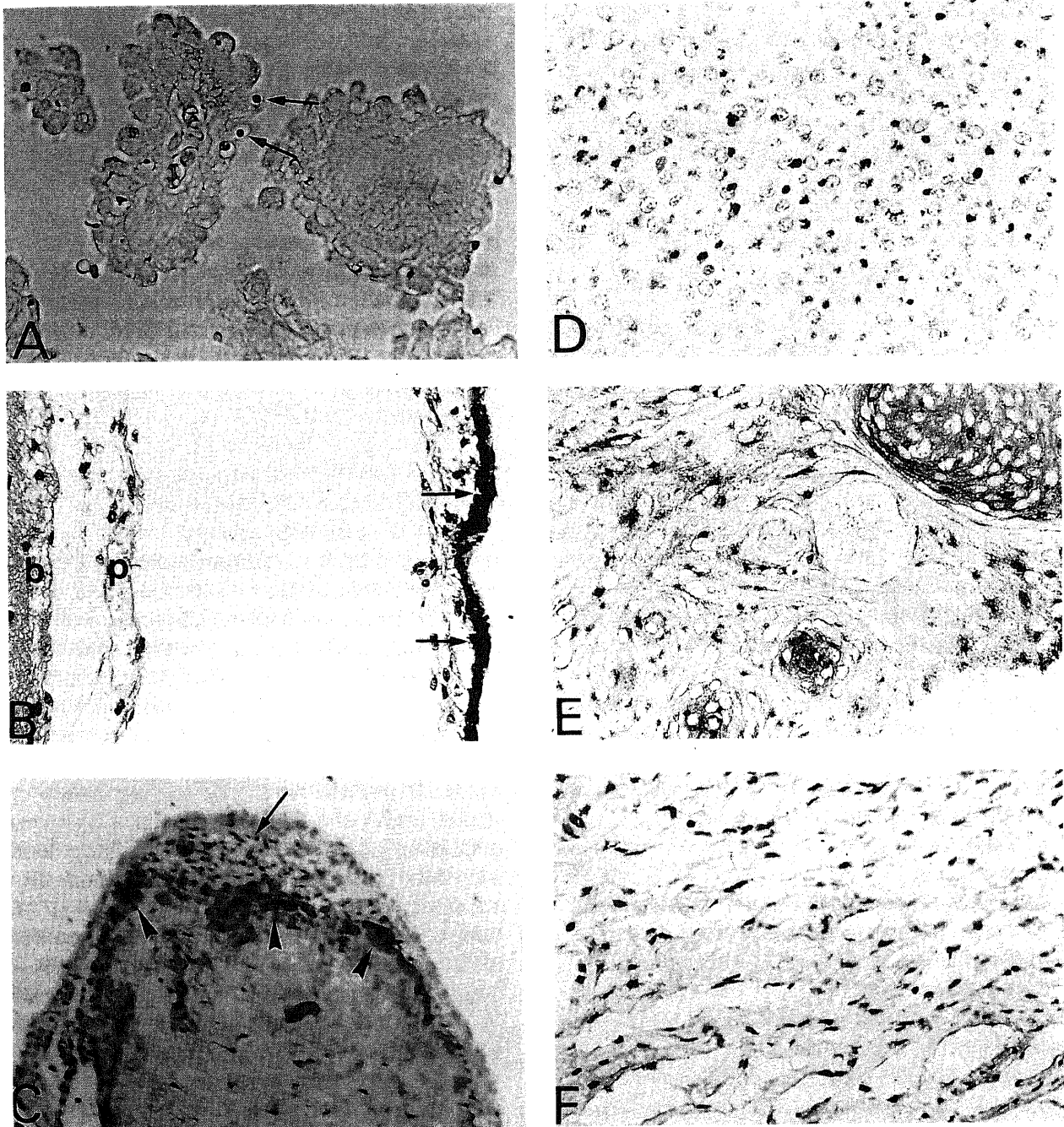


Fig. 4 Immunohistochemical localization of prostaglandin  $D_2$  synthase (PGDS). PGDS was reacted with polyclonal antibody using biotinylated anti-rabbit IgG and avidin-biotin-peroxidase complex, and was counterstained with hematoxylin. In choroid plexus (A), PGDS was detected as coarse granules in choroid epithelium (arrows in A). In arachnoid (B), arachnoid barrier layer (arrows in B) were positive, whereas pia matter (p in B) and brain (b in B) were negative. In arachnoid villi (C), PGDS was intensely stained in the arachnoid cells of the central core (arrowheads in C), but was negligible in the cap cell cluster (arrow in C). In the syncytial (D), transitional (E), and fibrous (F) meningiomas, PGDS was detected in the cytoplasm of all types, but was weak in the fibrous type. A,  $\times 200$ ; B,  $\times 100$ ; C,  $\times 50$ ; D, E and F,  $\times 200$ .

ヒト PGDS 血清を得た。

#### V. ウェスタンブロット

Laemmli の方法<sup>18)</sup>に従って、組織をホモジナイズし蛋白を調整した後、SDS-PAGE を行った。アクリルアミドゲルの濃度は14%とし、各試料は総蛋白量で 50  $\mu$ g に揃えて電気泳動を行った。泳動後、蛋白をニトロセルロース膜 (Clear Blot Membrane-P, ATTO, 東京) に転写し、0.1% ツイーン20と1%牛血清アルブミンを含んだ TBS でブロッキングを行った後、5000倍に希釈したウサギ抗ヒト PGDS ポリクローナル抗体と1時間反応させた。次にアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体と反応させ、最後にアルカリホスファターゼ基質キット (VECTOR RED, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) を用いて発色を行った。

#### VI. 免疫組織化学

4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィンに包埋した標本より厚さ 4  $\mu$ m の切片を作製し、ポリ-L-リジン (和光純薬、大阪) 処理スライドガラスに張り付け乾燥させた。次に切片をウマ IgG にてブロッキングした後、5000倍に希釈したウサギ抗ヒト PGDS ポリクローナル抗体と4時間反応させた。さらにビオチン標識抗ウサギ IgG と反応させた後、ABC キット (Vector Laboratories Inc.) を用いて発色を行った。最後に蒸留水で反応を止め、ヘマトキシリンで核染色を行い、水溶性封入剤で封入した。

### 成 績

#### I. RT-PCR

PGDS と GAPDH の cDNA はそれぞれ342塩基対と600塩基対のバンドとして検出された。脈絡叢、くも膜絨毛、および髄膜腫のいずれにおいても PGDS cDNA の増幅がみられた。脈絡叢とくも膜絨毛では増幅に差異はみられなかった。髄膜腫においては、合胞体型と移行型では脈絡叢やくも膜絨毛と同程度の増幅がみられたが、線維型では有意に増幅は少なかった (図1)。

#### II. ウェスタンブロット

PGDS 蛋白は、23kDa のバンドとして検出され、脈絡叢、くも膜絨毛、および髄膜腫のいずれにおいてもその発現がみられた。脈絡叢とくも膜絨毛では同程度の発現がみられた。

髄膜腫においては、全例において蛋白の発現がみられたものの、発現量と組織型とに相関はみられなかった (図2)。

#### III. 組織内ハイブリダイゼーション

##### 1. 脈絡叢

脈絡叢では髄液腔に接する脈絡上皮に、PGDS mRNA の発現がみられたが、間質の線維性組織や脈管には発現はみられなかった (図3A)。

##### 2. くも膜およびくも膜絨毛

くも膜においてはくも膜上皮細胞層 (barrier cell layer) に mRNA の発現がみられた (図3B)。一方、くも膜絨毛では外表を覆う厚いくも膜細胞層 (cap cell cluster) には mRNA の発現はみられず、むしろくも膜絨毛の芯を構成している部分 (central core) のくも膜細胞 (core arachnoid cell) に発現がみられた (図3C)。

##### 3. 髄膜腫

合胞体型と移行型では不均一ではあるものの大多数の腫瘍細胞に mRNA の発現がみられた (図3D, E)。特に移行型では渦状紋 (whorl) や砂粒体 (psammoma) を取り囲む腫瘍細胞に集中

して発現する傾向があった。線維型 (図3F) では、mRNA を発現する腫瘍細胞はまばらにみられるのみであった。

#### IV. 免疫組織化学

##### 1. 脈絡叢

mRNA の発現がみられた脈絡上皮細胞内に分泌顆粒様に PGDS 蛋白の発現がみられたが、間質の細胞には PGDS 蛋白の発現はみられなかった (図4A)。

##### 2. くも膜とくも膜絨毛

くも膜においてはくも膜上皮細胞層 (barrier cell layer) に PGDS 蛋白の発現がみられたが、その直下のくも膜梁柱細胞 (trabecular cell) には発現はみられなかった (図4B)。くも膜絨毛では表層のくも膜細胞 (cap cell cluster) には PGDS 蛋白の発現はみられず、中芯部のくも膜細胞 (core arachnoid cell) に発現がみられた (図4C)。一方、隣接する軟膜や脳実質には全く発現はみられなかった (図4Bのpならびにb)。

##### 3. 髄膜腫

全ての組織型において、PGDS 蛋白は核に隣接して粗大顆粒状に染色されていた。合胞体型と移行型では不均一ではあるものの大多数の腫瘍細胞に PGDS 蛋白の発現がみられたが、間質や血管には発現はみられなかった (図4D, E)。また、移行型では渦状紋や砂粒体を取り囲む腫瘍細胞に集中して発現する傾向があった。線維型では PGDS 蛋白の発現はわずかしみられなかった (図4F)。

### 考 察

プロスタグランدينはアラキドン酸を基質にシクロオキシゲナーゼによって合成される長鎖脂肪酸である<sup>19)</sup>。プロスタグランدينは、その作用機序や阻害物質については従来より多くの研究がなされており、炎症惹起や平滑筋の収縮、弛緩などの生理活性を持つことが知られている。しかし、PGD<sub>2</sub> に関しては、生理活性のみならず発現部位も長期にわたり不明であった。ところが、1991年、Hayaishi ら<sup>9)</sup>は PGD<sub>2</sub> が中枢神経内において特異的に産生され、視索前野にて内因性の睡眠誘導物質として作用していることを報告した。その後 PGD<sub>2</sub> は体温調節や黄体形成ホルモンの放出などにも関係していることが報告され<sup>10)</sup>、現在では中枢神経における生体調節物質として重要な機能を担っているとされている。PGD<sub>2</sub> の半減期は約30分<sup>20)</sup>で、生体内ではすみやかに分解されるため、PGD<sub>2</sub> そのものの生体内での働きを知ることはきわめて困難である。そこで、最近では PGD<sub>2</sub> そのものよりもむしろその合成酵素である PGDS を対象に検索がなされている。

PGDS は、脳脊髄液中においてアルブミンに次いで2番目の濃度を持つ、いわゆるベータトレース ( $\beta$ -trace) 蛋白と同一物質であることが、1993年、Zahn ら<sup>2)</sup>によって証明された。ベータトレース蛋白は、髄液中蛋白の約8%を占め、その濃度は1.4-4.0mg/100ml と、血清中の数百倍であるため、血清漏出蛋白ではなく、中枢神経で独自に合成され脳脊髄液中に分泌されているものと考えられてきた<sup>20)</sup>。

1993年、Urade ら<sup>8)</sup>はラット中枢神経における PGDS の発現を組織内ハイブリダイゼーション法で解析し、mRNA が脈絡叢とくも膜に特異的に発現しているとした。さらに、Nagata ら<sup>11)</sup>はアミノ酸配列の解析により PGDS がリポカリンファミリー (lipocalin family) に属することを報告した。リポカリンは分泌型蛋白の一つで、 $\beta$ -ラクトグロブリンや $\alpha$ 2-ミクログロブリン



などが含まれ, 疎水性物質の輸送蛋白であることが知られている<sup>12)</sup>. 本研究で示した如く, ヒトにおいても脈絡叢やくも膜細胞などで PGDS の発現がみられた. 特に脳脊髄液の主たる産生場である脈絡叢上皮細胞では分泌顆粒様に発現がみられたことより, ヒトにおいても PGDS はリポカリンとして脳脊髄液中での物質輸送に関わっているものと推定される. 脈絡叢は分布する毛細血管が有窓型で, 漏出した血清をもとに脈絡上皮が脳脊髄液を産生し分泌するとされている. しかし, 脈絡叢は単なる血液の濾過装置ではなく, トランスサイレチン<sup>23)</sup>を初め, トランスフェリン<sup>23)</sup>, セルロプラスミン<sup>24)</sup>およびレチノール結合蛋白<sup>25)</sup>などの輸送蛋白をその上皮で産生している. 1992年, Nilsson ら<sup>26)</sup>は中枢神経とくも膜下腔との間に脳脊髄液を介した神経内分泌経路が存在することを報告した. 本研究の結果からも, ヒトの脈絡叢は様々な物質を産生, 分泌することによって, 脳脊髄液を介して中枢神経に対して積極的に液性調節を行っていることが推定された.

一方, くも膜とくも膜細胞における PGDS の発現に関しては, 本研究で示した如く, 微妙な差異がみられた. すなわち, 解剖学的にはくも膜のくも膜上皮層 (barrier cell layer) はくも膜細胞のくも膜上皮 (cap cell cluster) に連続している<sup>27,28)</sup>ので, 両者を構成するくも膜細胞は同一の性質を持つものと推定される. したがって, PGDS の発現様式に関しても両者間で差異がないことが予測されたが, 結果的にはくも膜上皮 (barrier cell layer) には強い発現がみられたが, くも膜細胞層 (cap cell cluster) ではみられなかった. Kida ら<sup>27)</sup>は電子顕微鏡による観察から, ビメンチン陽性の中間径フィラメントの発現の程度は, くも膜上皮 (barrier cell layer) のくも膜細胞とくも膜細胞層 (cap cell cluster) のくも膜細胞とは異なることを報告した. すなわち, くも膜上皮 (barrier cell layer) のくも膜細胞がくも膜細胞層 (cap cell cluster) へと分化していく際に, 細胞の持つ主たる機能が物理的な保護から脳脊髄液排出へと変化し, それに伴い発現する蛋白にも違いが生じてきたのではないかと推定される.

神経膠腫に次いで2番目に多い脳腫瘍である髄膜腫は, くも膜細胞の分布と一致して発生することより, くも膜細胞を構成するくも膜細胞に由来するとされている<sup>29,30)</sup>. 髄膜腫は病理組織学的には合胞体型 (syncytial type), 移行型 (transitional type), および線維型 (fibrous type) の3つの基本的組織型に分類されているが, その他多くの亜型が存在する<sup>30)</sup>. これは, 髄膜腫の発生母地であるくも膜細胞が, 形態的多様性を持つくも膜細胞から構成されているためであると思われる<sup>27)</sup>. 合胞体型と移行型はその組織学的特徴の類似性により, くも膜細胞のくも膜細胞層 (cap cell cluster) を構成するくも膜細胞から発生するとされ, 線維型は線維性被膜 (fibrous capsule) に含まれる硬膜辺縁細胞 (dural border cell) から発生するとされている<sup>30)</sup>. 本研究では, 3つの基本的組織型に関して PGDS の発現を検討したが, 線維型では他の2型に比べ mRNA のみならず蛋白の発現量が非常に少なかった. この様な組織型による発現の差異は, 前述の発生母地の違いに由来すると考えられる. いずれにしても, 髄膜腫の大多数を占める合胞体型と移行型で強い発現がみられたことより, 髄膜腫の組織診断上の特異的マーカーあるいは腫瘍マーカーとして PGDS を応用しようと考えられた.

髄膜腫においては, PGDS の発現は渦状紋や砂粒体の周囲の腫瘍細胞に集中してみられた. 渦状紋と砂粒体は, いずれもくも膜細胞と髄膜腫の両方に共通して認められる特徴的な構

造<sup>30,32)</sup>で, 砂粒体は一般に渦状紋の中心部に形成される. 砂粒体の形成に関しては, Yamashima ら<sup>33)~35)</sup>はタンニン酸を用いた電顕的観察よりミエリン状構造を示す膜外のリン脂質が前駆体として重要であることを報告している. したがって, 細胞膜リン脂質に源を発するアラキドン酸カスケードに属する PGDS が, 砂粒体の周辺に強く発現しているということは, 砂粒体の形成と PGDS とに何らかの関係があることを示唆する. この点に関しては, 今後さらにアラキドン酸カスケードの上流に位置するシクロオキシゲナーゼやホスホリパーゼ A<sub>2</sub> などの発現についても検討を加えることにより, 明確な結論が得られるものと思われる.

## 結 論

ヒトの脈絡叢とくも膜組織, および髄膜腫における PGDS の発現に関して, RT-PCR, ウェスタンブロット, 組織内ハイブリダイゼーション, および免疫組織化学的手法を用いて検索した.

1, 脈絡叢, くも膜組織, および髄膜腫の全例において, PGDS の mRNA と蛋白の発現がみられた.

2, 脈絡叢では上皮に分泌顆粒様に PGDS の発現がみられ, くも膜ではくも膜上皮 (barrier cell layer) に発現がみられた. したがって, これらの組織から脳脊髄液中に PGDS が産生分泌されていることが推定された.

3, 髄膜腫では合胞体型と移行型では PGDS の強い発現が認められたが, 線維型ではその発現は少なかった.

4, 髄膜腫では, 特に合胞体型と移行型において, 渦状紋と砂粒体の周囲の腫瘍細胞に PGDS の発現が強く, 砂粒体の形成における PGDS の関与が推定された.

## 謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部脳神経外科学教室の山下純宏教授に深甚なる謝意を表します. また, 終始直接の御指導を賜りました同教室の山崎哲盛助教授に心から感謝いたします. さらに, 御支援と御協力を頂きました金沢大学脳神経外科学教室の皆様, ならびに大阪バイオサイエンス研究所所長早石修博士, 同分子行動生物部門奥出良博博士に深く御礼申し上げます.

なお, 本研究の一部は第14回日本脳腫瘍病理研究会 (1996, 東京), 第55回日本癌学会総会 (1996, 横浜), 第55回日本脳神経外科学会総会 (1996, 富山) において発表した.

## 文 献

- 1) Claussen J. Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 107: 170-172, 1961
- 2) Zahn M, Mader M, Schmidt B, Bollensen E, Felgenhauer K. Purification and N-terminal sequence of  $\beta$ -trace, a protein abundant in human cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 154: 93-95, 1993
- 3) Hoffmann A, Conradt HS, Gross G, Nimtz M, Lottspeich F, Wurster U. Purification and chemical characterization of  $\beta$ -trace protein from human cerebrospinal fluid: its identification as prostaglandin D synthase. *J Neurochem* 61: 451-456, 1993
- 4) Watanabe K, Urade Y, Mader M, Murphy C, Hayaishi O. Identification of beta-trace as prostaglandin D synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 1110-1116, 1994
- 5) White DM, Mikol DD, Espinosa R, Weimer B, Le BM,

- Stefansson K. Structure and chromosomal localization of the human gene for a brain form of prostaglandin D<sub>2</sub> synthase. *J Biol Chem* 267: 23202-23208, 1992
- 6) Igarashi M, Nagata A, Toh H, Urade Y, Hayaishi O. Structural organization of the gene for prostaglandin D synthase in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5376-5380, 1992
  - 7) Urade Y, Fujimoto N, Kaneko T, Konishi A, Mizuno N, Hayaishi O. Postnatal changes in the localization of prostaglandin D synthetase from neurons to oligodendrocytes in the rat brain. *J Biol Chem* 262: 15132-15136, 1987
  - 8) Urade Y, Kitahama K, Ohishi H, Kaneko T, Mizuno N, Hayaishi O. Dominant expression of mRNA for prostaglandin D synthase in leptomeninges, choroid plexus, and oligodendrocytes of the adult rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9070-9074, 1993
  - 9) Hayaishi O. Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: roles of prostaglandins D<sub>2</sub> and E<sub>2</sub>. *Faseb J* 5: 2575-2581, 1991
  - 10) Hayaishi O, Matsumura H, Urade Y. Prostaglandin D synthase is the key enzyme in the promotion of physiological sleep. *J Lipid Mediat* 6: 429-431, 1993
  - 11) Nagata A, Suzuki Y, Igarashi M, Eguchi N, Toh H, Urade Y, Hayaishi O. Human brain prostaglandin D synthase has been evolutionarily differentiated from lipophilic-ligand carrier proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4020-4024, 1991
  - 12) Pervaiz S, Brew K. Homology and structure-function correlations between a 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *Faseb J* 1: 209-214, 1987
  - 13) Thompson EG. *The CSF Proteins: A Biochemical Approach*. Elsevier, Amsterdam, 1st ed, 1988
  - 14) Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. *Histological Typing of Tumors of the Central Nervous System*, 2nd ed, p11-30, Springer-Verlag, Berlin, 1991
  - 15) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
  - 16) van Belkum A, Linkels E, Jelsma T, van den Berg FM, Quint W. Non-isotopic labeling of DNA by newly developed hapten-containing platinum compounds. *BioTechniques* 16: 148-153, 1994
  - 17) Jelsma T, Houthoff HJ. Increased labeling of DNA probes for in situ hybridization with the Universal Linkage System (ULS). *J NIH Res* 5: 82, 1994
  - 18) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 227: 680-685, 1970
  - 19) Albert L Lehninger, David L Nelson, Michael M Cox. *Principles of Biochemistry*, 2nd ed, p642-687, Worth Publishers Inc., New York, 1993
  - 20) Ujihara M, Urade Y, Eguchi N, Hayashi H, Ikai K, Hayaishi O. Prostaglandin D<sub>2</sub> formation and characterization of its synthetases in various tissues of adult rats. *Arch Biochem Biophys* 260: 521-531, 1988
  - 21) Felgenhauer K, Schädlich HJ, Nekic M.  $\beta$ -Trace protein as marker for cerebrospinal fluid fistula. *Klin Wochenschr* 65: 764-768, 1987
  - 22) Herbert J, Wilcox JN, Pham KT, Fremerey RT, Zeviani M, Dwork A, Soprano DR, Makover A, Goodman DS, Zimmerman EA, Roberts JL, Schon EA. Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. *Neurology* 36: 900-911, 1986
  - 23) Aldred AR, Dickson PW, Marley PD, Schreiber G. Distribution of transferrin synthesis in brain and other tissues in the rat. *J Biol Chem* 262: 5293-5297, 1987
  - 24) Aldred AR, Grimes A, Schreiber G, Mercer JF. Rat ceruloplasmin. Molecular cloning and gene expression in liver, choroid plexus, yolk sac, placenta, and testis. *J Biol Chem* 262: 2875-2878, 1987
  - 25) Duan W, Schreiber G. Expression of retinol-binding protein mRNA in mammalian choroid plexus. *Comp Biochem Physiol B* 101: 399-406, 1992
  - 26) Nilsson C, Lindvall AM, Owman C. Neuroendocrine regulatory mechanisms in the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Brain Res Rev* 17: 109-138, 1992
  - 27) Kida S, Yamashita T, Kubota T, Ito H, Yamamoto S. A light and electron microscopic and immunohistochemical study of human arachnoid villi. *J Neurosurg* 69: 429-435, 1988
  - 28) Yamashita T. Functional ultrastructure of cerebrospinal fluid drainage channels in human arachnoid villi. *Neurosurgery* 22: 633-641, 1988
  - 29) 太田富雄. 髄膜腫. 脳神経外科学, 第6版, 472-495頁, 金芳堂, 京都, 1991
  - 30) 脳腫瘍全国統計委員会, 日本病理学会. 脳腫瘍取り扱い規約, 第1版, 94-98頁, 金原出版, 東京, 1995
  - 31) Yamashita T, Kida S, Yamamoto S. Ultrastructural comparison of arachnoid villi and meningiomas in man. *Mod Pathol* 1: 224-234, 1988
  - 32) 平野朝雄. meningioma. 神経病理を学ぶ人のために, 第3版, 308-314頁, 医学書院, 東京, 1992
  - 33) Kubota T, Yamashita T, Hasegawa M, Kida S, Hayashi M, Yamamoto S. Formation of psammoma bodies in meningocytic whorls. Ultrastructural study and analysis of calcified material. *Acta Neuropathol Berl* 70: 262-268, 1986
  - 34) Yamashita T, Kida S, Kubota T, Yamamoto S. The origin of psammoma bodies in the human arachnoid villi. *Acta Neuropathol Berl* 71: 19-25, 1986
  - 35) Yamashita T, Yamashita J. Histological, ultrastructural and chromatographical discrimination of phospholipids in meningiomas. *Acta Neuropathol Berl* 80: 255-259, 1990

**Expression of Prostaglandin D<sub>2</sub> Synthase in Human Choroid Plexus, Arachnoid and Meningiomas** Kazushige Sakuda, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **105**, 788—795 (1996)

**Key words** prostaglandin D<sub>2</sub> synthase, choroid plexus, arachnoid, arachnoid villi, meningioma

#### Abstract

Expression of prostaglandin D<sub>2</sub> synthase (PGDS) in human choroid plexus, arachnoid, arachnoid villi, and meningiomas was examined. The materials were 2 samples of choroid plexus obtained at surgery, 6 arachnoid tissues obtained at autopsy, and 20 cases of meningiomas obtained at surgery. Meningiomas were histologically comprised of 12 syncytial, 7 transitional, and 1 fibrous types. Reverse transcription-PCR and Western blot analyses using rabbit polyclonal antibody indicated that PGDS and its mRNA were consistently expressed in choroid plexus, arachnoid villi and meningiomas. The band intensities of fibrous meningioma was, however, less prominent compared to those of the other histological types, choroid plexus and arachnoid villi. *In situ* hybridization was performed to confirm the cells were actually producing PGDS. In choroid plexus, the signals were recognized in choroid epithelium. Furthermore, in arachnoid, the signals were recognized in the barrier cell layer, while in arachnoid villi, the signals were detected in core arachnoid cells underneath cap cell cluster. In meningiomas, the signals were recognized in the tumor cells of the syncytial and transitional types. In contrast, the signals were sparsely recognized in the fibrous type. Immunohistochemistry revealed that PGDS was detected in the choroid epithelium as coarse granules, and was also intense in the arachnoid barrier cells. In arachnoid villi, it was stained not in the cap cell cluster but in the core arachnoid cells. In meningiomas, the immunoreactivity for PGDS was diffusely observed in the tumor cells of syncytial and transitional types, especially, around whorls and psammomas. The expression of PGDS in fibrous type was heterogeneous, and weaker compared to the other two types. These data suggest that choroid epithelium and arachnoid barrier cells may produce PGDS, and secrete it into the cerebrospinal fluid. The distinct expression pattern of this enzyme in meningiomas may be closely related to the derivation of this tumor from different cytogenesis within arachnoid villi. Furthermore, PGDS may participate in the formation of whorls and psammoma bodies.